

Cycle cellulaire et apoptose : le gène suppresseur de tumeur p53

► Le gène suppresseur de tumeur p53 est le gène le plus fréquemment muté dans les cancers humains. La protéine p53 est stabilisée en réponse à de nombreux phénomènes moléculaires parmi lesquels on peut noter des lésions de l'ADN, l'hypoxie ou des infections virales, mais aussi l'activation d'oncogènes qui provoquent différents phénomènes cellulaires comme l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la sénescence ou la différenciation. Une fois stable, la protéine p53 est activée par phosphorylation, déphosphorylation et acétylation, et elle devient un puissant facteur de transcription spécifique d'une séquence de l'ADN. Le vaste spectre des effets biologiques de la p53 s'explique en partie par sa capacité d'activer l'expression de nombreux gènes, parmi lesquels p21 (WAF-1), GADD45, 14-3-3sigma, bar, BRG2, PIG3, IGF-BP3, etc. La protéine p53 peut provoquer ou faciliter l'apoptose au travers de plusieurs mécanismes. Ainsi, elle règle l'expression de gènes qui participent à la réponse apoptotique, et elle joue elle-même un rôle transcriptionnel. Il semble exister dans les cellules

aussi bien des caractéristiques propres d'expression de la p53 que des sensibilités différentes à ses différents effets pro-apoptotiques. ◀

Le gène suppresseur de tumeur p53 code pour une phosphoprotéine nucléaire dont la fonction est altérée dans plus de 50% des cancers humains [1]. Il s'agit de l'altération génétique la plus fréquemment observée, tous types de tumeurs confondus. En 1984, il avait été montré que l'irradiation de cellules de souris par les UV induit une accumulation de la protéine p53 dans le noyau de cellules [2]. Cette observation a été ignorée pendant près de 10 ans puis redécouverte récemment. Ce phénomène n'est pas limité aux UV, mais s'étend à tous les traitements, physiques ou chimiques, qui provoquent des lésions de l'ADN [3]. Cette accumulation de protéine p53 sauvage peut avoir deux effets exclusifs sur les cellules : (1) un blocage transitoire du cycle cellulaire au niveau des phases G1 et G2. Cet arrêt de la division cellulaire est mis à profit par la cellule pour induire une réponse de type SOS, permettant la réparation des lésions; (2) dans d'autres cas, la p53 sauvage induit l'apoptose des cellules [4]. Les facteurs qui régissent ce choix « arrêt du cycle cellulaire/apoptose » ne sont pas connus à l'heure actuelle [5]. Dans des cellules exprimant une p53 mutée, il n'y a ni arrêt cellulaire, ni

Thierry Soussi

T. Soussi: Laboratoire de génotoxicologie des tumeurs, Université Pierre-et-Marie Curie et Institut Curie, 26, rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France.

apoptose après que l'ADN ait été endommagé. La transfection de p53 sauvage dans ces cellules conduit à la restauration de ce choix « arrêt du cycle cellulaire/apoptose ». La p53 sauvage agirait donc comme un agent décisionnel essentiel au maintien de l'intégrité du génome [5]. En revanche, les cellules tumorales ayant une p53 mutée ne sont plus capables d'assurer le maintien de l'intégrité génétique, car la cellule ne reçoit plus de signal d'arrêt de division. On se trouve donc en présence d'une cellule ayant une importante instabilité génétique permettant l'émergence de clones cellulaires de malignité accrue. Avec ce modèle, on comprend mieux le phénotype des lignées de souris chez lesquelles le gène p53 a été éliminé: ces souris restent viables tout en ayant une fréquence élevée de cancers [6]. Ce phénotype est tout à fait similaire à celui de patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni (syndrome de cancers héréditaires) [7] chez lesquels une mutation constitutionnelle du gène p53 est retrouvée. La fonction de p53 ne se limite pas à la protection contre les lésions génotoxiques. D'autres types de perturbations cellulaires comme l'activation d'oncogènes cellulaires, l'hypoxie, ou des anomalies de concentration des ribonucléotides cellulaires conduisent

TIRÉS À PART

T. Soussi.

à l'activation de p53 et à l'arrêt du cycle cellulaire [8]. Les voies de signalisation qui activent la protéine p53 après ces divers *stress* cellulaires sont multiples [8]. Enfin, la découverte de deux gènes homologues de *p53*, *p73* et *p63*, montre que cette transmission du signal est sûrement beaucoup plus complexe que nous ne l'avions imaginé il y a quelques années [9]. La fonction biologique de ces protéines n'est pas connue à l'heure actuelle, mais il a été montré que *p73* est activée par la protéine c-Abl à la suite des lésions génotoxiques provoquées par les radiations γ ou le *cis*-platine [10-12].

p53 et arrêt du cycle cellulaire

L'implication du gène suppresseur de tumeur *p53* dans la transition G1/S est relativement bien documentée [13]. La protéine p53 transactive le gène codant pour l'inhibiteur des cycline kinases $p21^{WAF1/CIP1}$. En se fixant sur les complexes cyclines/CDK, la protéine $p21^{WAF1/CIP1}$ inhibe la phosphorylation de la protéine Rb. Cette dernière reste complexée aux facteurs de transcription de la famille E2F qui ne peuvent activer la phase S. Les cellules déficientes pour le gène $p21^{WAF1/CIP1}$ présentent également des anomalies de l'arrêt du cycle cellulaire après lésions génotoxiques. Plusieurs travaux récents montrent que l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 après lésions génotoxiques est véritablement dépendant de p53. Le facteur clé pour cette transition G2/M est le complexe *cdc2*-cycline B1. Il est cytoplasmique et ne rentre dans le noyau qu'au moment de la mitose. Le gène *14-3-3 σ* , transactivé par p53, est capable de séquestrer ce complexe *cdc2*-cycline B1 dans le cytoplasme pour provoquer un arrêt de la division cellulaire en phase G2. Des cellules dans lesquelles les deux copies du gène *14-3-3 σ* ont été invalidées ne sont plus capables d'induire cet arrêt de la division cellulaire [14]. L'irradiation de ces cellules induit une mitose anormale qui conduit à leur mort par des mécanismes qui ne sont pas apoptotiques. Un second gène transactivé par p53, *GADD45a*, est également important pour le contrôle de la transition G2/M. L'invalidation de ce gène chez des souris conduit à un phénotype très proche

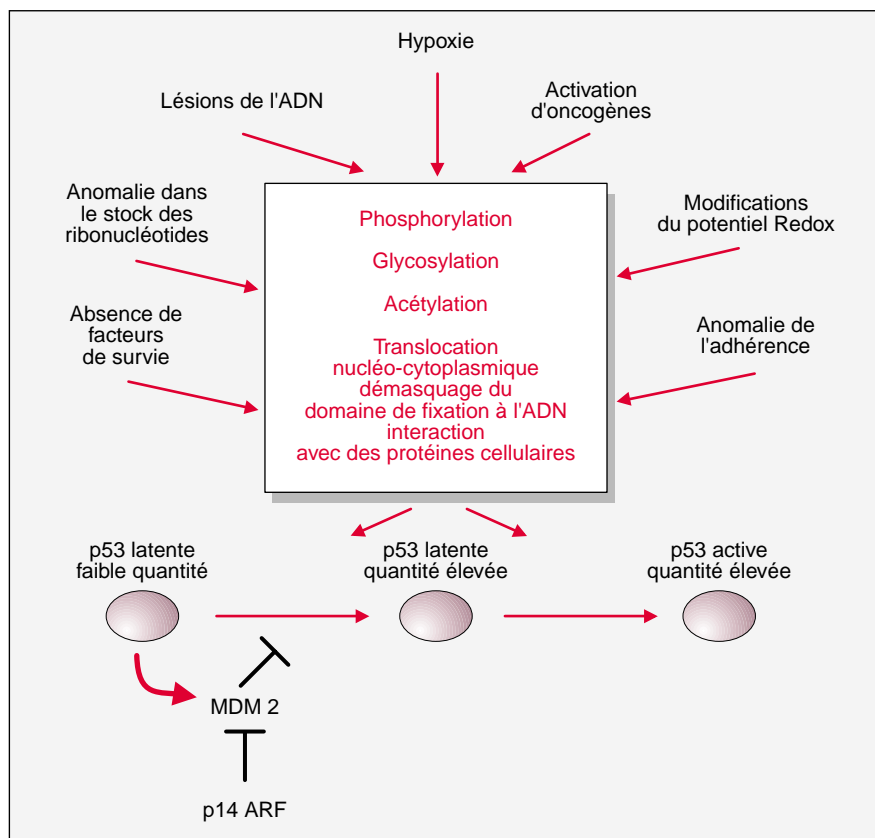


Figure 1. **Hétérogénéité des signaux pouvant induire une activation de la protéine p53.** Dans la plupart des cas, c'est au niveau de la protéine p53 que l'activation se fait. On peut penser que ce type de régulation a évolué pour permettre une réponse très rapide.

de celui des souris nullizygotés pour le gène *p53*. Les cellules de ces souris *GADD45A^{-/-}* présentent une forte aneuploidie et de nombreuses anomalies chromosomiques [15]. Après irradiation, il n'y a plus d'arrêt en phase G2. La surexpression de *GADD45* est capable d'induire un blocage de la division cellulaire en phase G2. L'ensemble de ces travaux indique que le rôle de p53 et de ses gènes cibles n'est pas cantonné à la phase G1 mais semble impliqué dans tous les points de contrôle du cycle cellulaire après lésions de l'ADN.

La régulation de p53 par la protéine mdm2

L'interaction entre les protéines p53 et mdm-2 a été très longtemps sous-estimée. Plusieurs travaux récents montrent que la protéine mdm2 est un partenaire essentiel dans le comportement de la p53 sauvage [16]. Mdm2 se fixe de façon spécifique sur la partie amino-terminale de la p53.

Cette interaction bloque le domaine de transactivation de la p53 et inhibe l'activité transcriptionnelle de p53. Plus récemment, il a été démontré que la fixation de mdm2 sur p53 induit une dégradation de la p53. La protéine mdm2 serait une ubiquitine ligase qui conduirait p53 vers le protéasome. Cette découverte est extrêmement importante car on sait que l'activation biologique de la p53 passe par des mécanismes de stabilisation/déstabilisation de la protéine sans aucune variation au niveau transcriptionnel. En effet, lorsque des cellules sont traitées par un agent génotoxique, il existe une augmentation de la quantité de protéine p53 cellulaire qui peut aller jusqu'à un facteur 20 à 50. Il s'agit d'une augmentation de la demi-vie de la protéine p53 car la transcription du gène ou la stabilité des ARNm ne sont pas modifiées par ce traitement. C'est l'interaction p53-mdm2 qui est la cible de cette régulation. Après lésions génotoxiques, il existe une

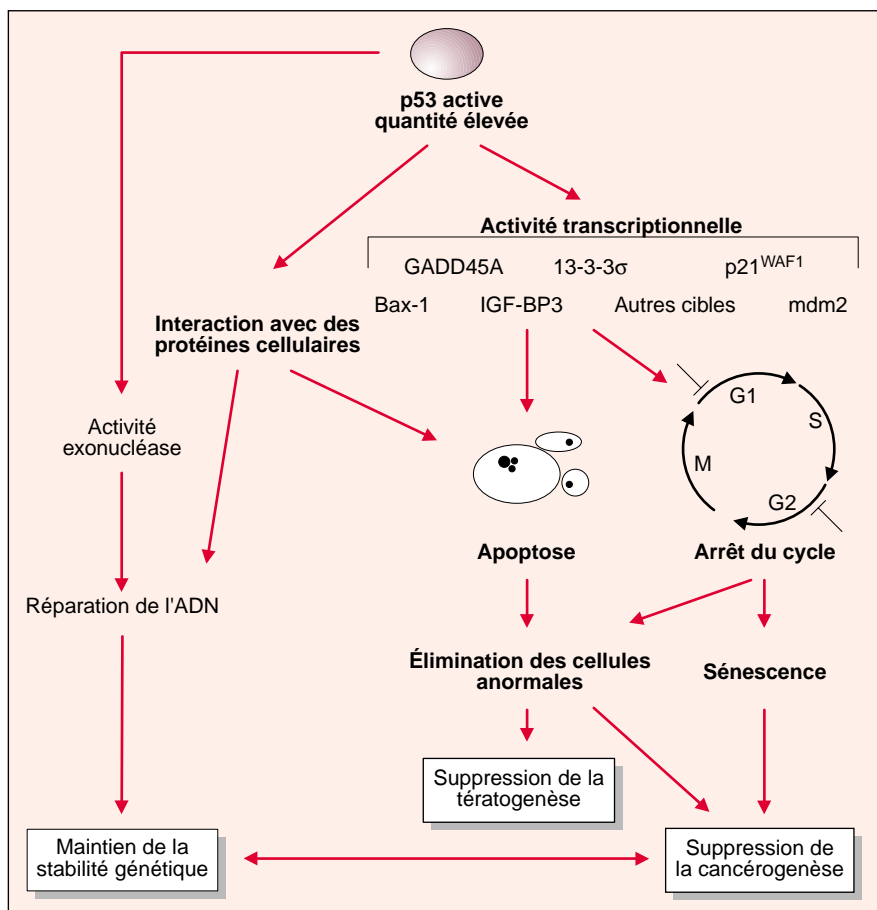


Figure 2. **Hétérogénéité des voies de signalisation utilisées par la protéine p53 pour assurer son rôle de gardien du génome.**

phosphorylation spécifique de la partie amino-terminale de la p53. Celle-ci bloque l'interaction p53-mdm2. Il en résulte une accumulation de la protéine p53 par diminution de sa dégradation dépendante de mdm2. Cette phosphorylation pourrait également servir au recrutement de facteurs de transcription qui favoriseraient cette activation transcriptionnelle. Les kinases impliquées dans ce phénomène ne sont pas formellement identifiées, mais le produit du gène *ATM* et l'ADN-PK semblent être de bons candidats. Il est fort possible que ces modifications post-traductionnelles soient différentes selon le type de lésions de l'ADN.

Parmi les gènes dont la transcription est activée par p53 se trouve le gène *mdm2*. Il en résulte une rétro-inhibition qui va conduire à la diminution du pool intranucléaire de p53, mdm2 jouant un peu le rôle de gardien de

p53. Ce rôle est d'ailleurs tout à fait en accord avec le phénotype des souris nullizygotiques pour le gène *mdm2*. Les souris *mdm2*^{+/-} sont viables et ne présentent aucun phénotype particulier mais les animaux homozygotes *mdm2*^{-/-} meurent *in utero* à cinq jours. L'analyse des fœtus suggère qu'il s'agirait d'apoptose. Les souris homozygotes pour la double délétion des gènes *mdm2* et *p53* (*mdm2*^{-/-}, *p53*^{-/-}) présentent de façon surprenante un développement embryonnaire normal et leur fréquence dans les portées est conforme à une transmission sans biais apparent. Il est vraisemblable que la grande quantité de p53 stable dans les embryons *mdm2*^{+/-} soit toxique et induise cette mort embryonnaire précoce qui peut être supprimée par l'abolition de l'expression de p53.

L'activation d'oncogènes cellulaires tels que *c-myc* ou *ras* est également

capable d'induire un arrêt de la division cellulaire dépendant de p53. Cet arrêt s'accompagne d'une accumulation de protéine p53 sauvage nucléaire, d'une induction de la protéine CDK1 p21^{CIP1/WAF1} et n'est pas observé dans des cellules exprimant une p53 mutante. Cette stabilisation de p53 est due à une dissociation des complexes p53/mdm2 par la protéine p14^{ARF} qui induit la translocation de mdm2 dans le nucléoplasme [17]. La protéine 14^{ARF} est codée par le locus *INK4a* qui code également, dans une autre phase de lecture, pour la protéine CDK1 p16.

Il semble donc y avoir de multiples voies métaboliques capables d'activer la protéine p53, qui interfère généralement avec le complexe p53-mdm2.

■ p53 et apoptose

Le rôle de la protéine p53 n'est pas aussi clair dans l'apoptose que dans l'arrêt du cycle cellulaire [18]. Cela est dû à l'hétérogénéité de cette fonction apoptotique. Il y aurait deux voies, l'une passant par l'activité de transactivation de la protéine et l'autre utilisant un mécanisme indépendant de la transcription. Pour la voie dépendante de la transcription, plusieurs gènes ont été identifiés. Il s'agit de *Bax*, *IGF-BP3* et *PIG3*. Il est fort possible que leurs contributions soient très variables selon le type cellulaire. Les mécanismes de l'apoptose indépendante de la transcription, induite par p53, ne sont pas connus. Ceux-ci impliqueraient des interactions protéine-protéine. La protéine 53BP2, qui interagit de façon compétitive avec p53 et Bcl2, est une bonne candidate. Il est également intéressant de noter que de faibles quantités de p53 sont capables de protéger les cellules de l'apoptose [19].

■ p53 et développement embryonnaire

Les souris nullizygotiques pour le gène *p53* peuvent présenter des malformations cranio-faciales et oculaires ainsi que des exencéphalies. La fréquence de ces altérations est variable suivant le fond génétique de la souris. L'irradiation de souris gestantes *p53*^{+/-} conduit à la formation d'embryons anormaux (20%) ou à la mort embryonnaire (60%). La même

irradiation chez des souris *p53*^{-/-} conduit à un résultat inverse (70 % d'anomalies et 7% de morts). L'examen des tissus fœtaux irradiés provenant de souris *p53*^{+/+} révèle une apoptose importante qui est quasi inexistante dans les tissus des souris *p53*^{-/-}. Ces observations ont conduit à proposer l'hypothèse selon laquelle p53 pourrait avoir un rôle dans la protection cellulaire durant l'embryogenèse [20]. Ce modèle est compatible avec l'observation d'une forte expression de la protéine p53 durant les phases précoces du développement embryonnaire.

Le choix arrêté du cycle-apoptose

Plusieurs facteurs semblent intervenir dans ce choix: la quantité de lésions de l'ADN, la quantité de p53 induite, le type cellulaire ou l'altération d'autres oncogènes. Il n'y a pas, à l'heure actuelle, de schéma unificateur qui pourrait rendre compte de l'hétérogénéité des études sur ce sujet. L'induction de p53 dans des cellules non transformées est généralement suivie d'un arrêt du cycle cellulaire alors qu'elle est capable d'induire l'apoptose dans des cellules transformées. Cette différence pourrait être due à l'expression élevée de E2F-1 dans les cellules tumorales. Une synergie entre E2F-1 et p53 pour induire l'apoptose a été observée dans de nombreux types cellulaires.

Conclusions

Le rôle de la protéine p53 dans le maintien de la stabilité du génome ne fait plus de doute. Contrairement aux modèles plus simples proposés il y a quelques années, p53 semble être au centre d'un carrefour décisionnel important à la suite de différents types de stress cellulaires. Plusieurs voies métaboliques différentes sont capables d'activer la p53. Par ailleurs, les fonctions de p53 sont multiples et hétérogènes. La sensibilité préférentielle des cellules tumorales à une apoptose induite par p53 est une voie de signalisation qui doit être approfondie. Elle pourrait être à la base de nouveaux développements thérapeutiques avec la possibilité d'induire spécifiquement une apoptose des cellules tumorales ■

Remerciements

L'auteur remercie K. Bensaad, M. Lebras et O. Tominaga pour leurs commentaires et leur aide dans la préparation de cet article. Les travaux réalisés dans notre laboratoire sont soutenus par la Ligue contre le cancer (comité national et de Paris), l'Association pour la recherche sur le cancer et le Groupement des entreprises françaises dans la lutte contre le cancer.

RÉFÉRENCES

1. Bérout C, Soussi T. p53 gene mutation: software and database. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 200-4.
2. Maltzman W, Czyzyk L. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in non transformed mouse cells. *Mol Cell Biol* 1984; 4: 1689-94.
3. Fritsche M, Haessler C, Brandner G. Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene* 1993; 8: 307-18.
4. Yonish-Rouach E, Resnitzky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991; 352: 345-7.
5. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88: 323-31.
6. Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 1992; 356: 215-21.
7. Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990; 250: 1233-8.
8. Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev* 1998; 12: 2973-83.
9. Kaelin WG. The emerging p53 gene family. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 594-8.
10. Agami R, Blandino G, Oren M, Shaul Y. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* 1999; 399: 806-9.
11. Jost CA, Marin MC, Kaelin WG. P73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nature* 1999; 399: 814-7.
12. Yuan ZM, Shioya H, Ishiko T, et al. Interaction of c-Abl and p73 alpha and their collaboration to induce apoptosis. *Nature* 1999; 399: 809-13.
13. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75: 817-25.
14. Chan TA, Hermeking H, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 14-3-3Sigma is required to prevent mitotic catastrophe after DNA damage. *Nature* 1999; 401: 616-20.

15. Hollander MC, Sheikh MS, Bulavin DV, et al. Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nat Genet* 1999; 23: 176-84.
16. Freedman DA, Wu L, Levine AJ. Functions of the MDM2 oncoprotein. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 96-107.
17. Tao W, Levine AJ. P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 6937-41.
18. Bates S, Vousden KH. Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 28-37.
19. Lässig P, Ferlin M, Piette J, Hibner U. Anti-apoptotic activity of low levels of wild-type p53. *EMBO J* 1996; 15: 4566-73.
20. Hall PA, Lane DP. Tumour suppressors: A developing role for p53? *Curr Biol* 1997; 7: R144-7.

ms2000

Summary

p53 in cell cycle and apoptosis

The *p53* tumor suppressor is the most commonly mutated gene in human cancer. The p53 protein is stabilized in response to different checkpoints activated by DNA damage, hypoxia, viral infection, or oncogene activation resulting in diverse biological effects, such as cell cycle arrest, apoptosis, senescence, differentiation and antiangiogenesis. The stable p53 protein is activated by phosphorylation, dephosphorylation and acetylation yielding a potent sequence-specific DNA-binding transcription factor. The wide range of p53's biological effects can in part be explained by its activation of expression of a number of target genes including p21(WAF1), GADD45, 14-3-3 sigma, bar, BTG2, PIG3, IGF-BP3 and others. p53 can induce or potentiate apoptosis through several mechanisms, both by regulating the expression of genes which can participate in the apoptotic response and through transcriptionally independent means. There appears to be cell type variability in both the response to p53 expression and in the requirement for p53 transcriptional transactivation for the induction of apoptosis.